



オートファジーを利用する細胞内物質の選択的分解法

著者	高橋 大輝
号	17
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第388号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126479

	たかはし だいき		
氏名（本籍地）	高橋 大輝		
学位の種類	博士（生命科学）		
学位記番号	生博第388号		
学位授与年月日	令和元年10月2日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）分子生命科学専攻		
論文題目	オートファジーを利用する細胞内物質の選択的分解法		
博士論文審査委員	（主査）	教授	有本 博一
		教授	福田 光則
		教授	田中 良和

論文内容の要旨

【分解にもとづく新しい創薬アプローチ】

生命科学研究において、RNA 干渉や CRISPR-Cas9 法に代表される遺伝子抑制手法は欠くことができないツールである。これに伴い核酸医薬など細胞内タンパク質レベルを制御する創薬手法が注目を集めている。RNA 干渉は、これから作られるタンパク質を抑制することができるが、すでに細胞内に存在するタンパク質の分解には関与しない¹。このためタンパク質レベル低下速度は緩やかであり、長寿命タンパク質に起因する疾患への効果は弱い。

上記の背景から、筆者は細胞内タンパク質の分解を誘起する低分子化合物の創出が重要と考えた。そこで、細胞内の主要分解系であるオートファジーに注目し、細胞内の特定基質の周囲で分解を促進する目印（分解タグ）となる分子を探索した。続いて、得られた分解タグを標的選択的に送達できるキメラ分子（AUTAC）を設計した。本論文では、AUTAC の細胞内標的タンパク質、機能不全ミトコンドリアの分解による疾患治療への可能性について記述する。

低分子医薬品が作用する対象はヒトプロテオーム全体の 20%にすぎず²、残りはアンドラッグブルとして手つかずの状態にある。細胞内標的の特異的分解にもとづく AUTAC 法は、従来の低分子医薬と全く異なる機能を有していることから創薬の可能性を大きく拡大することに貢献すると考えられる。

【研究背景】

細胞内の主要な分解システムであるオートファジーは、細胞内物質のターンオーバーによって恒常性を維持している³。細胞内に蓄積した有害物の除去はオートファジーの重要な機能のひとつと考えられている。機能不全ミトコンドリアや細胞内病原体などは選択的オートファジーによって排除されるので⁴、何らかの分解の目印となる化学構造が存在すると予想される。

当研究室の伊藤・斎藤らは、細胞内 A 群連鎖球菌に対する抗菌オートファジーに、タンパク質の cGMP 修飾（S-グアニル化）が関与することを示した^{5,6}。細菌周囲の S-グアニル化がオートファゴソームへの取り込みを促進する。このことは S-グアニル化が選択的分解の目印として機能すること示唆したが、細菌由来の別の成分と S-グアニル化が共に必要となる可能性も残されていた。

【オートファジー分解の目印としての S-グアニル化】

S-グアニル化単独でオートファジーを誘起できるか検討した。HeLa 細胞内に発現させた人工基質 EGFP に HaloTag 技術を利用して S-グアニル化を導入したところ、オートファジー分解が観察された。この際 LC3 陽性の EGFP ドットと、K63 型ユビキチン鎖、オートファジーレセプター p62 の共局在が認められた。

この結果は、*S*-グアニル化に被修飾基質のオートファジー分解を誘起する能力があり、しかも細菌由来成分が関与しないことを示すものである。

【cGMP 構造の改変による新規分解タグの創製】

S-グアニル化を疾患関連タンパク質に導入し、特異的分解を促進することは新たな創薬手法として魅力的である。しかし、cGMP 構造を含む *S*-グアニル化は、医薬品に適した化学構造とは言えない。環状リン酸部位の負電荷は細胞膜透過性に不利であり、cGMP がプロテインキナーゼ G 活性化などオートファジー以外の生物活性を持つことも課題である。

当研究室における過去の構造活性相関研究を参考に、環状リン酸部分を削除した「改良 *S*-グアニル化」修飾を開発した。人工基質 EGFP のオートファジー分解を再度確認することができたので、本論文では改良 *S*-グアニル化を以降の検討に使用した。

【内因性タンパク質を分解できるキメラ化合物：AUTAC】

これまでの検討には HaloTag 技術を用いてきたため、標識化されていない内因性タンパク質の分解には応用できなかった。内因性の分解標的へのターゲティング能を付与するために、分解タグと別の低分子を結合したキメラ分子（Autophagy-targeting Chimera: AUTAC）を考案した。医薬品研究の長い歴史のなかで疾患標的的特異的に結合する低分子が多く見出されているからである。ここでは、信頼できる特異のリガンドが報告されている FK506 binding protein (FKBP12), Methionine aminopeptidase2 (MetAP2), Bromo domain containing4 (Brd4) を取り上げて、AUTAC による分解効果を検証した。

【プロテアソームを利用する関連技術との差別化】

細胞内タンパク質レベルを特異的抑制する関連技術として、Proteolysis targeting chimera (PROTAC) がある⁷。PROTAC もまたキメラ分子であり、分解標的とユビキチン E3 リガーゼの近接化を促進する。例えば、E3 リガーゼ：セレブロンに結合する PROTAC は、標的タンパク質の K48 型ユビキチン化をもたらす結果、ユビキチン-プロテアソームによる分解を促進する。PROTAC をもとにした臨床治験薬もすでに開発されていることから世界中で注目が集まっている。

本博士論文で開発した AUTAC と PROTAC の大きな違いは、基盤とする細胞内分解システムにある。AUTAC が K63 型ユビキチン化を介した「選択的オートファジー」により標的を分解するため、細胞小器官やタンパク質凝集体など、細胞内の広範な物質を標的にできる。一方で、ユビキチン-プロテアソーム系に基づく PROTAC 法は、細胞内の可溶性タンパク質にのみ適用できると考えられている。

【ミトコンドリアを標的とした AUTAC の開発】

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生を行う重要な細胞小器官である。エネルギー

ギー産生の過程で活性酸素が発生することから、ミトコンドリアは傷害を受け⁸、その蓄積が疾患の誘発につながることが分かっている。機能不全ミトコンドリアの除去が多くの疾患の根本的治療につながると期待されている。

筆者は、ミトコンドリア外膜上に分解タグを送達できる mito-AUTAC を開発した。ミトコンドリアは、細胞内で動的に融合と断片化を繰り返し、そのサイズが変化する。機能不全ミトコンドリアでは、断片化した小さなミトコンドリアの比率が増加することが知られている⁹。検討の結果、mito-AUTAC によるミトコンドリア分解は、ミトコンドリアサイズに大きく影響を受けることが判明した。分解は断片化した小さなミトコンドリアで優先して起きるため、ミトコンドリア品質を改善することができる。分解に伴って、ミトコンドリアの生合成が促進されることも分かった。例えば、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP を用いて細胞死を誘導する試験において、AUTAC は有意な細胞保護効果を示した。

疾患により関連が深い実験系として筆者は次にダウン症に着目した。ダウン症由来ヒト線維芽細胞では、恒常的にミトコンドリア形態の顕著な断片化と膜電位低下がみられる。ここに mito-AUTAC を3日間処理した結果、融合して繊維状となった正常形態のミトコンドリアが増加し、ミトコンドリア膜電位レベルも回復した。また、機能不全の解消に伴って細胞内 ATP 量が増加することがわかった。

ミトコンドリア機能障害に由来する疾患に対しては、対症療法しか治療法がない。断片化したミトコンドリアの分解を促進する AUTAC は、ミトコンドリア関連疾患の根本的な治療法に繋がることが期待される。

【結論】

本博士論文は、*S*-グアニル化が単独でオートファジー分解のタグとして機能することを明らかにした。続いて、cGMP 部の構造変換を行い、薬剤として優れた「改良 *S*-グアニル化タグ」を開発した。このタグを標的タンパク質に送達するキメラ分子 (AUTAC) は、狙ったタンパク質の選択的オートファジー分解を可能にした。また、機能不全ミトコンドリアを標的とした mito-AUTAC は、細胞保護効果を示すとともに、ダウン症由来培養細胞のミトコンドリア機能を顕著に改善することが示された。

参考文献

1. Khvorova, A. & Watts, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology* **35**, 238–248 (2017).
2. Russ, A. P. & Lampel, S. The druggable genome: an update. *Drug Discov. Today* **10**, 1607–1610 (2005).
3. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
4. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease

- through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).
- 5.Sawa, T. *et al.* Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 727–735 (2007).
- 6.Ito, C. *et al.* Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol. Cell* **52**, 794–804 (2013).
- 7.Toure, M. & Crews, C. M. Small-molecule PROTACS: New approaches to protein degradation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**, 1966–1973 (2016).
- 8.Li, X. *et al.* Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology* **6**, 19 (2013).
- 9.Gottlieb, R. A. & Gustafsson, Å. B. Mitochondrial turnover in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1813**, 1295–1301 (2011).

謝辞

本研究は分子情報化学分野において有本博一教授指導のもと実施された。一部の実験は、当分野の一刀かおり博士，佐藤彩美修士，森山純氏，中村友恵氏，島田祐嗣氏，三木恵理香氏との共同研究である。また，東京生化学研究会からの奨学補助金にも深謝する。

論文審査結果の要旨

オートファジーは、細胞内分解を通じて恒常性維持や疾患の抑制に貢献している。高橋大輝氏提出の博士論文は、任意の細胞内物質をオートファジー分解する手法の開発について述べている。序論では、細胞内タンパク質の働きを抑制する方法について現状をまとめている。特に、特定のタンパク質をプロテアソーム分解に導く分子 PROTAC に言及し、同様の選択的分解をオートファジーを用いて達成することの意義に触れている。一般にオートファジーは非選択的な分解プロセスと考えられているが、抗菌オートファジーなど選択性を持つケースがあることを論じた。

続いて、本論では選択的分解を可能にするタグとして *S*-グアニル化を取り上げた。まず、*S*-グアニル化がオートファジー機構をリクルートすることを、HaloTag 技術を活用して証明した。続いて、*S*-グアニル化構造を含むキメラ型化合物を調製し、3つの細胞内タンパク質を選択分解することに成功し、これを AUTAC と呼ぶことを提唱した。さらに AUTAC と PROTAC の比較考察から、AUTAC が機能不全ミトコンドリアの除去に適用できる可能性を指摘した。

HaloTag 技術、もしくはキメラ型化合物 AUTAC を用いて、ミトコンドリア外膜に *S*-グアニル化を導入するとミトコンドリアのユビキチン化が誘導された。さらにストレス条件下においてミトコンドリア断片化を誘起すると、マイトファジーによる分解が進行した。つまり、機能不全に陥った断片化ミトコンドリアを AUTAC が選択的除去できることを示した。このことを裏付けるためミトコンドリア機能不全を示す疾患患者由来のヒト繊維芽細胞に AUTAC を投与すると、短期間の培養によりミトコンドリアの形状や機能が正常化することも明らかとなった。

S-グアニル化を起点とする選択的オートファジーは、もともと抗菌オートファジー研究の過程で見出された。そこで、著者はオートファゴソームの形状や、誘導に関わる ULK1 複合体など諸因子への依存性などを比較解析して AUTAC の作用機序についても有用な知見を得た。

上記の研究成果は、疾患に関連する細胞内物質を狙って分解することを可能とし、創薬科学を革新する可能性を秘める独創的成果であり、高橋氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、高橋大輝氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。